

FALLON

FOR DU PONT USE ONLY

TRANSLATION

EUROPEAN PATENT APPLICATION

PUBLICATION NO. 316 702 A2

International Classification⁴: C12N 1/16, C12P 7/44

Application No. 88118506.0. Date of application: 7 November 1988.
Priority: 16 November 1987, DE 3738812. Date of publication of application:
24 May 1989, Bulletin 89/21.

Designated contracting states: AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Applicant:

[REDACTED] Formhandelsgesellschaft

Inventors:

Dr. Bettina Kopp-Holzwiesche and Dr. Joachim Schindler [REDACTED]

Title:

MICROBIAL SYNTHESIS OF DODECANEDICARBOXYLIC ACID

Summary

For a process for fermentative transformation of fatty acid ester mixtures which contain at least portions of lauric acid ester into dicarboxylic acids with the same C atom number relative to the fatty acid part a microorganism is made available which displays a higher transformation speed for C₁₂ compounds than for their higher homologs. This was possible due to the fact that the transformation is conducted in the presence of a strain of micro-organism *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) and/or its mutants and/or variants which display the ability to transform methyl laurate into alpha-omega dicarboxylic acids at a higher transformation rate than its higher homologs.

Description

The invention concerns the field of the specific transformation of C₁₂ fatty acid esters into alpha-omega dicarboxylic acids and makes new mutants of *Candida tropicalis* as well as a suitable process for the selective transformation of methyl laurate available.

Dicarboxylic acids with more than 10 C-atoms are difficult to synthesize by the methods of preparative organic chemistry on an industrial scale. This is especially true for the dicarboxylic acids which display, besides the two terminal carboxyl groups, additional functional groups such as double bonds or hydroxyl groups.

Therefore it has been attempted to produce dicarboxylic acids preparatively from the readily accessible raw materials using the metabolic functions of the various microorganisms. Thus in German patent 21 40 133 it was proposed that yeasts of the genus *Candida* or *Pichia* be allowed to act on alkanes, primary alkanols or carboxylic acids under fermentation conditions. In the case when a special strain of *Candida lipolytica* is used, for example, dicarboxylic acids are produced whose C-chain is not significantly degraded relative to the initial material, if at all, and which otherwise display no changes such as the introduction of new functional groups. Similar processes which start with different raw materials in which other special microorganisms are used are described in US patents 3 975 234 and 4 339 536, British patent 1 405 026 and in German OS 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 and 29 51 177.

The US patent 4 474 882 has unsaturated dicarboxylic acids as its subject. These are obtained by using a strain of the species *Candida tropicalis* for transforming

unsaturated monocarboxylic acids with 14 to 22 C atoms. The unsaturated dicarboxylic acids correspond in number and position of the double bond to the initial materials.

By all of the processes mentioned, however, the desired dicarboxylic acids can only be obtained in very small quantities. Thus in the US patent cited with a fermentation time of two days yields of dicarboxylic acid of between 0.65 g/l and maximally 1.96 g/l are mentioned. These yields are too low for an industrial process.

In the unpublished German patent application, file number P 37 21 119.6 a mutant of *Candida tropicalis* is described which is capable of transforming substrates with a chain length of 14 C-atoms, e.g. methyl myristate, selectively into a dicarboxylic acid with 14 C-atoms.

Against the background of this state of the art, the desire existed to have a microorganism available that was capable of transforming the esters of lauric acid such as methyl laurate into the corresponding dicarboxylic acid and at the same time displaying a higher transformation rate for C₁₂ compounds than for their higher homologs (C₁₄, C₁₆, C₁₈). Besides this yields sufficient for an industrial process should be achieved.

The subject of the invention is therefore a strain of *Candida tropicalis* with the file designation DSM 4277 (DC2-C2009) (filed according to the Budapest Treaty) as well as its mutants and variants displaying the ability to transform methyl laurate at a higher transformation rate than its higher homologs into alpha-omega dicarboxylic acids.

Another subject of the invention is a process for the fermentative transformation of fatty acid ester mixtures containing at least a portion of lauric acid esters into dicarboxylic acids with the same C-atom number relative to the fatty acid part,

characterized by the fact that the transformation is conducted in the presence of a strain of microorganism *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277)(filed according to the Budapest Treaty) and/or its mutants and/or variants which display the ability to transform methyl laurate with a higher transformation rate than its higher homologs into alpha-omega dicarboxylic acids.

The strain of *Candida tropicalis* DC2-C2009 used according to the invention (filed according to the Budapest Treaty) was obtained by mutation and selection from the publicly available strain *Candida tropicalis* ATCC 20336. Besides the registered strains its mutants and variants are also capable of being used if they possess the above-mentioned ability for preferential transformation of lauric acid esters into dodecanedicarboxylic acid.

Such mutant strains can be obtained by mutation and selection, especially by multiple mutation and multiple selection. The mutation can be accomplished, e.g. by high energy irradiation such as UV or x-ray bombardment. But treatment of the cells with mutagens is also especially suitable. Suitable mutagenic agents include, for example, nitrosoguanidine compounds such as 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine or ethylmethane sulfonate; here one can refer to the publically available data on the state of the art, see also, for example, US patent 4 029 549, column 2, line 57 ff, with the instructions contained there.

To produce mutants which are suitable for the process according to the invention the conditions of concentration and time of exposure to the mutagenic agent must be selected such that the initial population is inactivated by 10 to 99.999% of the treatment. A kill rate of 50 to 99.9% is preferably selected.

For the following selection of the mutants according to the invention from the large population of microorganisms after the mutation treatment the culture conditions are selected under which the modified specific properties of the mutant strains that have evolved become a selection advantage or become recognizable. The microorganism population obtained after the mutation, for example, can be incubated on a minimal medium for selection which contains as the only carbon source the substrates used in the process according to the invention. Those mutated microorganisms which have lost their ability, because of the mutation treatment, to grow on the now present carbon source can no longer reproduce when incubated in the separation medium. Therefore they do not grow. Another part of the mutant population which was either not sufficiently damaged during the mutation treatment or suffered other defects is enabled to grow on the carbon source of the separation medium. During the incubation, therefore, a proliferation occurs. In order to achieve separation the separation medium contains substances which cause the growing strains to be killed because of their growth or during their growth without damaging the non-growing mutant strains. Such a separation is possible, e.g. by the addition of antibiotics such as nystatin.

Another possibility of mutant separation in this stage is the incorporation of cell damaging, especially reactive, components, into the part of the mutant population growing on the separation medium. For example, the incorporation of ^{32}P into the growing strains is suitable. This is possible, e.g. by the joint use of correspondingly radioactively labeled salts of a phosphoric acid in the nutrient solution of this selection

step. For separation by ^{32}P the joint use of $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ in the nutrient solution has proven especially effective.

From the thus enriched mutants, then, e.g. using the well known Lederberg stamp method the mutant strains sought according to the invention (defect block mutant strains) can be isolated. For details on the procedure used here and the antibiotic enrichment method as well the Lederberg stamp method one is referred, for example, to J. Amer. Chem. Soc. 70, 4267, (1948) Davis B.D. (Antibiotic-enrichment method), J. Bact. 63, 399 (1952) Lederberg, J., Lederberg, E.M. (Lederberg stamp method).

For further selection of the mutants the expert will consider their ability for preferential conversion of lauric acid esters compared to its higher homologs. He will also consider the quantity of dicarboxylic acids produced. Thus dodecane-dicarboxylic acid can be produced according to the invention under shaking flask conditions in quantities of at least 10 g/l per 96 hours of transformation time from methyl laurate.

The mutants according to the invention themselves do not transform lauric acid into dodecane-dicarboxylic acid. Rather lauric acid already in concentrations greater than 0.1 wt. % has a cytotoxic action. For the expert, therefore, the high transformation power for esters such as lauric acid is all the more surprising.

As preferred initial products in the process according to the invention the esters of lauric acid-rich fatty acid mixtures with C_1 to C_6 alcohols, especially C_1 to C_6 monoalcohols may be used. Thus, especially, one may use methyl esters of coconut oil or palmseed oil or the methyl laurate-richer cuts produced from it by enrichment and distillation procedures. Also suitable are fully synthetically produced fatty acid ester

mixtures which contain at least some proportion of esters of lauric acid. From these mixtures dodecane-dicarboxylic acid is preferentially formed.

The expert in any case will note the fact that the content of free lauric acid is set as low as possible.

A group of monocarboxylic acid esters which can be used in the process of the invention as the initial materials includes the esters of carboxylic acids which are accessible by oligomerization of ethylene and corresponding transformation.

As regards the alcohol part of the esters used it can be said that esters of alcohols of a functionality of 1 to 4 and a C-atom number of 1 to 6 are suitable. However, the esters of monoalcohols, especially the esters of short-chained monoalcohols such as methanol or ethanol are preferred. The fermentation medium used to carry out the process of the invention corresponds to the media well known and described for the cultivation of *Candida*, especially microorganisms of the species *Candida tropicalis*.

Suitable fermentation media contain the usual trace elements, a nitrogen source and besides this a carbon source not identical with the substrate to be transformed. The term trace elements here refers to the salts of cations of ammonium, potassium, sodium, magnesium, calcium, manganese, zinc, iron or the anions of phosphate, sulfate, chloride. As the nitrogen source one may use, besides inorganic compounds, also peptone, yeast extract or corn steep liquor.

The fermentation solution also contains a co-substrate as the carbon source. As a co-substrate, for example, one may use sodium acetate. It is also possible to use as the

co-substrate ordinary sugars such as glucose, fructose, maltose, trehalose and the like. Especially preferred co-substrates are glucose and glycerine.

In implementing the process it has been found advisable to operate in two steps. In the first step the microorganisms are cultivated. At this time it may be desirable to adjust the pH to values smaller than 7, e.g. to a value between 5.5 and 7 and to hold it constant and thus to select the co-substrate quantity in such a way that co-substrates are practically totally consumed by the end of the first step.

In the second step the fatty acid ester to be transformed can be added, in which case at the beginning of the step the pH is set at between 7.1 and 8, especially to a value around 7.2. It has also been found to be advisable in the second step after an induction phase of several hours, e.g. 4 to 8 hours, to meter in enough co-substrate to preserve the cell respiration. The expert for this purpose will check the oxygen content of the fermentation batch with a suitable electrode. It has also been found to be advisable gradually to add the initial product to be transformed during the fermentation time.

The dicarboxylic acids forming according to the invention may be present in part as monoesters. From the monoesters the free acids can be obtained by saponification by known methods.

According to another version of the process of the invention it is preferred to add emulsifiers to the initial compounds intended for transformation for better distribution in the fermentation medium. Thus favorable results are achieved if a total of 0.1 to 3 wt. %, relative to the fermentation medium, of emulsifiers are present. Suitable here are physiologically tolerable emulsifiers and especially physiologically tolerable non-ionic

emulsifiers. Thus, for example, sugar esters or sorbitan esters, ethoxylated sugar esters, ethoxylated sorbitan esters as well as alkyl glycosides may be used for this.

Other accessory materials which may be added in the process according to the invention are foam inhibitors. Biocompatible foam inhibitors are preferred, such as those based on polypropylene glycol. If necessary other ordinary accessories may be added.

The dicarboxylic acids obtained by the process of the invention correspond in their chain length to the acid part of the esters used. Because of the higher substrate specificity for C₁₂ esters dodecanedicarboxylic acid (decanedicarboxylic acid) of particular purity is formed. Thus from technical methyl laurate the above named acid can be obtained in a 98% purity.

For many uses the saturated dicarboxylic acid mixtures produced by the fermentation can be used directly. Thus the mixtures can be used, for example, directly for modification of polymers, especially resins.

The following examples were performed with the strain *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277).

Examples

Example 1

1. Culture conditions and reaction process

1.1. Maintenance of strains

Malt extract slant tubes and lyophilizates

1.2. Shaking flasks (100 ml working volume)

1.2.1. Pre-culture I

24 hour incubation of a slant tube inoculum in 100 ml of YM Bouillon (yeast-malt-extract-bouillon) pH 6 (Difco Co) at 30°C and 150 rpm on the shaking machine.

Pre-culture II

Yeast-nitrogen-base (Difco)	0.67 %
Sodium acetate	0.3 %
Peptone	0.3 %
Yeast extract	0.5 %
Glucose	2 %
Dissolved in 0.1 M phosphate buffer	
pH	7.2

Batch: 100 ml in 500 ml Erlenmeyer baffle flask

Inoculum 10 ml pre-culture I

Incubation at 30°C and 150 rpm shaking rate until total consumption of the glucose (ca. 24 hours)

1.2.2. Transformation culture

Yeast-nitrogen-base (Difco)	0.67 %
ethoxylated sorbitan monooleate	0.2 %
methyl laurate (technical)	4 %
Phosphate buffers 0.2 M	
pH	8

Batch: 50 ml in 500 ml Erlenmeyer baffle flask

Inoculum 50 ml pre-culture II

Reaction pH 7.2

Incubation at 30°C at 150 rpm shaking speed maintaining a glucose free induction phase (4 - 8 hours)

Daily addition of 0.5 % glucose at the end of the induction phase

Daily adjustment of pH to 7.2

Daily sampling

After 96 hours of transformation time the dodecane- dicarboxylic acid yield was 10 g/l.

Example 2

2. Production in the small fermentor

2.1. Small fermentation (1.5 l working volume)

Device type Biostat E by Braun Company (stirring fermenter)

2.2. Pre-culture

24 hours of incubation of a slant tube inoculum in wort bouillon (150 ml - Merck Company)

2.3. Fermenter culture

2.3.1. Medium

Glucose	3	%
Yeast extract	0.3	%
Corn steep liquor	0.1	%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	%
NH_4NO_3	0.1	%
NaH_2PO_4	0.1	%
K_2HPO_4	0.15	%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	%
KCl	0.05	%
MnCl_2	0.05	%
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	%
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005	%
Biotin	0.0001	%
Ethoxylated sorbitan monooleate	0.2	%
pH	6.0	

2.3.2. Conducting the process

Ventilation 1 vvm., stirring speed 900 rpm, anti-foam based on polypropylene

glycol, automatic pH regulation, pO_2 electrode, growth phase up to total consumption of glucose (24 to 30 hours).

pH Shift from 6.0 to 7.2, simultaneously addition of 2% methyl laurate.

Substrate addition semi-continuous over the entire fermentation.

Co-substrate addition (glucose) as required adapted to cell respiration but earliest dose after a 4 to 8 hour induction phase.

Daily sampling.

After 120 hours of transformation time the dodecane-dicarboxylic acid yield was 40 g/l.

Example 3

To determine the selectivity of the mutants used, with the aid of the *Candida tropicalis* strain DC2-C2009 (DSM 4277) a series of different substrates were converted. The following yields were obtained:

Chain length	Alkane	Mono acid	Methyl ester
C12	2-3 g/l	0	10-12 g/l
C13	1 g/l	3 g/l	2 g/l
C14	1 g/l	4 g/l	3 g/l
C15	Trace	n.b.	n.b.
C16	0	0	1 g/l
n.b. = not determined			

Claims

1. *Candida tropicalis* strain with the file designation DSM 4277 and its mutants and variants which display the ability to convert methyl laurate into alpha-omega dicarboxylic acids with a higher transformation rate than its higher homologs.
2. Process for fermentative transformation of fatty acid ester mixtures which contain at least portions of lauric acid esters into dicarboxylic acids with the same C-atom number relative to the fatty acid part, characterized by the fact that the conversion is conducted in the presence of a microorganism strain of *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) and/or its mutants and/or variants which display the ability to transform methyl laurate into alpha-omega dicarboxylic acids with a higher transformation rate than its higher homologs.

3. Process as in one of claims 1 or 2 characterized by the fact that the esters of lauric acid-rich fatty acid mixtures with C₁-C₆ alcohols, preferably monoalcohols, are used as initial products.

4. Process as in one of claims 1 through 3 characterized by the fact that methyl esters of coconut oil or palmseed oil or fully synthetically synthesized methyl laurate mixtures and/or their distillates or enrichment products are used as the initial product.

5. Process as in one of claims 1 - 4 characterized by the fact that the *Candida tropicalis* strain DC2-C2009 is cultivated in a first step until the practically total consumption of the co-substrate at a constant pH less than 7 but greater than 5.5, the pH is then raised to a value between 7.1 and 8 and then once or several times the fatty acid mixture is added, after which an induction phase of several hours has passed as much co-substrate is fed in as necessary to maintain cell respiration.

6. Process as in one of claims 1 through 5 characterized by the fact that emulsifiers, foam inhibitors and possibly other accessories are added to the fermentation medium.

Translation:
Language Services Unit
Cytech Languages, Inc.
July 18, 1994



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

0 316 702
A2

~~DE 126 45~~

② EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

③ Anmeldenummer: 88118506.0

④ Int. Cl. C12N 1/16 , C12P 7/44

⑤ Anmeldetag: 07.11.88

Der (Die) Mikroorganismus (Mikroorganismen) ist (sind) bei Deutsche Sammlung von Mikroorganismen unter der Nummer 4277 hinterlegt worden.

⑥ Priorität: 16.11.87 DE 3738812

⑦ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.05.89 Patentblatt 89/21

⑧ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑨ Anmelder: Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien
Postfach 1100 Henkelstrasse 67
D-4000 Düsseldorf 1(DE)

⑩ Erfinder: Kopp-Holtwiesche, Bettina, Dr.
Weststrasse 33
D-4000 Düsseldorf 13(DE)
Erfinder: Schindler, Joachim, Dr.
Am Eichelkamp 158
D-4010 Hilden(DE)

⑪ Mikrobielle Synthese von Dodecandsäure.

⑫ Für ein Verfahren zur fermentativen Umwandlung von Fettsäureestergemischen, die zumindest anteilsweise Laurinsäureester enthalten, in Dicarbonsäuren mit gleicher C-Atomanzahl, bezogen auf den Fettsäureteil, soll ein Mikroorganismus zur Verfügung gestellt werden, der eine höhere Transformationsgeschwindigkeit für C₁₂-Verbindungen als für deren höhere Homologe aufweist. Dies gelang dadurch, daß die Umwandlung in Gegenwart eines Mikroorganismenstammes *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) und/oder dessen Mutanten und/oder Varianten, die die Fähigkeit aufweisen, Methylaurat mit höherer Transformationsgeschwindigkeit als dessen höhere Homologe in α - ω -Dicarbonsäuren umzuwandeln, durchgeführt wird.

Mikrobielle Synthese von Dodecandisäure

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der spezifischen Umwandlung von C₁₂-Fettsäureestern zu alpha-omega-Dicarbonsäuren, und stellt für die gezielte Umwandlung von Methyllaurat neue Mutanten von *Candida tropicalis* sowie ein geeignetes Verfahren zur Verfügung.

5 Dicarbonsäuren mit mehr als 10 C-Atomen sind nach Methoden der präparativen organischen Chemie im technischen Maßstab schwer herstellbar. Dies gilt insbesondere für Dicarbonsäuren, die außer den beiden endständigen Carboxylgruppen noch weitere funktionelle Gruppen wie Doppelbindungen oder Hydroxylgruppen aufweisen.

Man hat daher versucht, aus gut zugänglichen Rohstoffen mit Hilfe der Stoffwechselaktivitäten verschiedener Mikroorganismen Dicarbonsäuren präparativ zu erzeugen. So wird in der deutschen Patentschrift 21 40 133 vorgeschlagen, auf Alkane, primäre Alkanole oder Carbonsäuren Helfer der Gattung *Candida* oder *Pichia* unter Fermentationsbedingungen einwirken zu lassen. Bei Einsatz von zum Beispiel einem speziellen Stamm von *Candida lipolytica* entstehen dabei Dicarbonsäuren, deren C-Kette gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht oder nicht wesentlich abgebaut ist und auch ansonsten keine Veränderungen wie Einführen 10 neuer funktioneller Gruppen aufweist. Ähnliche Verfahren, die von anderen Rohstoffen ausgehen, bei denen spezielle andere Mikroorganismen eingesetzt werden sind beschrieben in den US-Patenten 3 975 234 und 15 4 339 536; in der britischen Patentschrift 1 405 021 sowie in den deutschen Offenlegungsschriften 21 64 628, 28 53 847, 29 37 292 und 29 51 177.

Das US-Patent 4 474 882 hat ungesättigte Dicarbonsäuren zum Gegenstand. Diese werden gewonnen, indem ein Stamm der Spezies *Candida tropicalis* zur Umwandlung von ungesättigten Monocarbonsäuren mit 14 bis 22 C-Atomen eingesetzt wird. Die ungesättigten Dicarbonsäuren entsprechen in der Anzahl und Lage der Doppelbindung den Ausgangsmaterialien.

Nach all den genannten Verfahren werden jedoch die gewünschten Dicarbonsäuren nur in recht kleinen Mengen erhalten. So sind im genannten US-Patent bei einer Fermentationsdauer von 2 Tagen Ausbeuten an Dicarbonsäure zwischen 0,65 g/l und maximal 1,96 g/l genannt. Für ein technisch genutztes Verfahren sind derartige Ausbeuten zu niedrig.

In der nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung, Aktenzeichen P 37 21 119.8 wird eine Mutante von *Candida tropicalis* beschrieben, die in der Lage ist, Substrate mit einer Kettenlänge von 14 C-Atomen, beispielsweise Methylmyristat gezielt in eine Dicarbonsäure mit 14 C-Atomen umzuwandeln.

30 Vor dem Hintergrund dieses Standes der Technik bestand der Wunsch, einen Mikroorganismus zur Verfüzung zu haben, der in der Lage ist, Ester der Laurinsäure, z.B. Methyllaurat, in die entsprechende Dicarbonsäure umzusetzen und der dabei eine höhere Transformationsgeschwindigkeit für C₁₂-Verbindungen als für deren höhere Homologen (C₁₄, C₁₆, C₁₈) aufweist. Darüber hinaus sollten für ein technisches Verfahren hinreichende Ausbeuten erreicht werden.

35 Gegenstand der Erfindung ist somit ein *Candida tropicalis*-Stamm mit der Hinterlegungsbezeichnung DSM 4277 (DC2-C2009) (hinterlegt nach Budapestster Vertrag) sowie dessen Mutanten und Varianten, die die Fähigkeit aufweisen, Methyllaurat mit einer höheren Transformationsgeschwindigkeit als dessen höhere Homologe in alpha-omega-Dicarbonsäuren umzuwandeln.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Umwandlung von Fettsäureestern, die zumindest anteilsweise Laurinsäureester enthalten, in Dicarbonsäuren mit gleicher C-Atomanzahl, bezogen auf den Fettsäureteil, dadurch gekennzeichnet, daß die Umwandlung in Gegenwart eines Mikroorganismenstamms *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) (hinterlegt nach Budapestster Vertrag) und/oder dessen Mutanten und/oder Varianten, die die Fähigkeit aufweisen, Methyllaurat mit höherer Transformationsgeschwindigkeit als dessen höhere Homologe in alpha-omega-Dicarbonsäuren 45 umzuwandeln, durchgeführt wird.

Der erfindungsgemäß eingesetzte Stamm *Candida tropicalis* DC2-C2009 (hinterlegt nach Budapestster Vertrag) wurde durch Mutation und Selektion aus dem öffentlich zugänglichen Stamm *Candida tropicalis* ATCC 20336 gewonnen. Außer dem hinterlegten Stamm sind auch dessen Mutanten und Varianten einsetzbar, soweit sie die o.g. Fähigkeit zur bevorzugten Umwandlung von Laurinsäureestern zu Dodecandisäure besitzen.

Derartige Mutantenstämme lassen sich durch Mutation und Selektion, insbesondere durch mehrfache Mutation und mehrfache Selektion gewinnen. Die Mutation kann beispielsweise durch energiereiche Bestrahlung wie UV- oder Röntgenstrahlung erfolgen. Geeignet ist insbesondere aber auch die Behandlung der Zellen mit mutagenen Agentien. Geeignete mutagene Agentien sind beispielsweise Nitrosoguanidinverbindungen - wie beispielsweise 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin - oder Ethylmethansulfonat. Im einzelnen

kann hier auf die allgemeinen Angaben des Standes der Technik verwiesen werden, siehe hierzu beispielsweise US-Patentschrift 4 029 549, Spalte 2, Zeilen 57 ff., mit den dort enthaltenen Verweisungen.

Zur Herstellung von Mutanten, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, werden die Bedingungen von Konzentration und Einwirkzeit des mutagenen Agens so gewählt, daß die Ausgangspopulation durch die Behandlung zu 10 bis 99,999 Prozent inaktiviert wird. Vorzugsweise wird eine Abtötungsrate von 50 bis 99.9 Prozent gewählt.

Zur nachfolgenden Auslese der erfindungsgemäß geeigneten Mutanten aus der großen Population der Mikroorganismen nach der Mutationsbehandlung werden Kulturbedingungen gewählt, unter denen die abgeänderten spezifischen Eigenschaften der entstandenen Mutantenstämme zum Selektionsvorteil werden oder erkennbar werden. Zur Selektion kann die nach der Mutation erhaltene Mikroorganismenpopulation beispielsweise auf einem Minimalmedium angebrütet werden, das als einzige Kohlenstoffquelle die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Substrate enthält. Diejenigen mutierten Mikroorganismen, die aufgrund der Mutationsbehandlung ihre Fähigkeit verloren haben, auf der jetzt vorliegenden Kohlenstoffquelle zu wachsen, können sich beim Bebrüten des Trennmediums nicht vermehren. Sie wachsen also nicht. Ein anderer Teil der Mutantenpopulation, der entweder bei der Mutationsbehandlung nicht hinreichend geschädigt worden ist oder andere Defekte erlitten hat, ist befähigt, auf der Kohlenstoffquelle des Trennmediums zu wachsen. Bei der Bebrütung tritt also eine Vermehrung ein. Um eine Trennung zu erreichen, enthält das Trennmedium Stoffe, die bewirken, daß die wachsenden Stämme aufgrund ihres Wachstums oder während ihres Wachstums abgetötet werden, ohne daß dabei die nicht wachsenden, Mutantenstämme geschädigt werden. Möglich ist eine solche Trennung beispielsweise durch Zusatz von Antibiotika, wie z.B. Nystatin.

Eine andere Möglichkeit der Mutantentrennung in diesem Stadium ist der Einbau von zellschädigenden, insbesondere reaktiven Komponenten in den auf dem Trennmedium wachsenden Anteil der Mutantenpopulation. Geeignet ist beispielsweise der Einbau von ^{32}P in die wachsenden Stämme. Möglich ist das beispielsweise durch Mitverwendung entsprechend radioaktiv markierter Salze der Phosphorsäure in der Nährösung dieses Selektionsschritts. Für die Trennung mittels ^{32}P hat sich insbesondere die Mitverwendung von $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ in der Nährösung bewährt.

Aus den somit angereicherten Mutanten können dann zum Beispiel mittels der an sich bekannten Lederbergschen Stempelmethode die erfindungsgemäß angestrebten Mutantenstämme (Defektblockmutantenstämme) isoliert werden. Bezüglich der hier eingesetzten Verfahrensweise und zur Antibiotika-Anreicherungsmethode und zur Lederbergschen Stempelmethode wird beispielsweise verwiesen auf J. Amer. Chem. Soc. 70, 4267, (1948) Davis, B.D. (Antibiotika-Anreicherungsmethode), J. Bact. 63, 399 (1952) Lederberg, J., Lederberg, E. M. (Lederbergsche Stempelmethode).

Zur weiteren Selektion der Mutanten wird der Fachmann deren Fähigkeit zur bevorzugten Umwandlung von Laurinsäureestern im Vergleich zu deren höheren Homologen berücksichtigen. Weiter berücksichtigen wird er die Menge der erzeugten Dicarbonsäuren. So kann erfindungsgemäß Dodecandsäure unter Sr²⁺-Üttelkolbenbedingungen in Mengen von mindestens 10 g/l pro 98 Stunden Transformationszeit aus Methyllaurat hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Mutanten setzen Laurinsäure selbst nicht zu Dodecandsäure um. Vielmehr wirkt Laurinsäure bereits in Konzentrationen von größer 0.1 Gew.-% zytotoxisch. Um so erstaunlicher für den Fachmann ist die hohe Transformationsleistung für Ester der Laurinsäure.

Als bevorzugte Ausgangsprodukte im erfindungsgemäßen Verfahren können die Ester laurinsäurericher Fettsäuremischungen mit C₁ bis C₆-Alkoholen, insbesondere C₁ bis C₄-Monoalkoholen eingesetzt werden. So können insbesondere Methylester von Kokosöl oder Palmkernöl oder daraus durch Anreicherungs- und Destillationsverfahren hergestellte methyllauratreichere Schnitte eingesetzt werden. Ebenso geeignet sind voll synthetisch hergestellte Fettsäureestergemische, die zumindest anteilweise Ester der Laurinsäure enthalten. Aus diesen Gemischen wird bevorzugt Dodecandsäure gebildet.

Der Fachmann wird in jedem Falle darauf achten, daß der Gehalt an freier Laurinsäure so gering wie möglich eingestellt wird.

Eine Gruppe von Monocarbonsäureestern, die im erfindungsgemäßen Verfahren als Ausgangsstoffe eingesetzt werden können, sind die Ester von Carbonsäuren, die durch Oligomerisierung von Ethylen und entsprechende Umwandlung zugängig sind.

Im Hinblick auf den Alkoholteil der eingesetzten Ester kann gesagt werden, daß Ester von Alkoholen einer Funktionalität von 1 bis 4 und einer C-Atom-Anzahl von 1 - 8 geeignet sind. Bevorzugt sind jedoch die Ester von Monoalkoholen, insbesondere die Ester von kurzkettigen Monoalkoholen, wie Methanol oder Ethanol. Das zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Fermentationsmedium entspricht den für die Anzucht von *Candida*, insbesondere von Mikroorganismen der Spezies *Candida tropicalis* bekannten und beschriebenen Modellen. Geeignete Fermentationsmedien enthalten die üblichen

Spurenelemente, eine Stickstoffquelle und darüber hinaus zusätzlich eine mit dem zu transformierenden Substrat nicht identische Kohlenstoffquelle. Unter Spurenelementen sind hier Salze der Kationen Ammonium, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium, Mangan, Zink, Eisen oder der Anionen Phosphat, Sulfat, Chlorid zu verstehen. Als Stickstoffquelle können neben anorganischen Verbindungen auch Pepton, Hefeextrakt oder Maisquellwasser eingesetzt werden.

Die Fermentationslösung enthält weiterhin als Kohlenstoffquelle ein Cosubstrat. Als Cosubstrat kann beispielsweise Natriumacetat eingesetzt werden. Weiterhin ist es möglich, daß als Cosubstrat übliche Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose und dergleichen eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Cosubstrate sind Glucose und Glycerin.

Bei der Durchführung des Verfahrens hat es sich als zweckmäßig erwiesen, in zwei Stufen zu arbeiten. In der ersten Stufe werden die Mikroorganismen angezüchtet. Dabei kann es gewünscht sein, den pH auf Werte kleiner 7, beispielsweise auf einen Wert zwischen 5,5 und 7 einzustellen und konstant zu halten und die Cosubstratmenge so zu wählen, daß Cosubstrate gegen Ende der ersten Stufe praktisch vollständig verbraucht ist.

In der zweiten Stufe kann der umzusetzende Fettsäureester hinzugefügt werden, wobei man allerdings zu Beginn der Stufe den pH auf Werte zwischen 7,1 und 8, insbesondere auf einen Wert um 7,2 einstellt. Es hat sich weiterhin als zweckmäßig erwiesen, in der zweiten Stufe nach einer Induktionsphase von mehreren Stunden, beispielsweise 4 bis 8 Stunden, so viel Cosubstrate zuzudosieren, daß die Zellatmung aufrecht erhalten bleibt. Der Fachmann wird hierzu mit einer geeigneten Elektrode den Sauerstoffgehalt des Fermentationsansatzes kontrollieren. Weiterhin hat es sich als zweckmäßig erwiesen, das umzuandelnde Ausgangsprodukt während der Fermentationsdauer nach und nach zuzufügen.

Die erfindungsgemäß entstehenden Dicarbonsäuren können anteilsweise als Monoester vorliegen. Aus den Monoestern können die freien Säuren in an sich bekannter Weise durch Verseifen gewonnen werden. Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, den zur Umwandlung vorgesehenen Ausgangsverbindungen zur besseren Verteilung im Fermentationsmedium Emulgatoren zuzulügen. So werden günstige Ergebnisse erzielt, wenn insgesamt 0,1 bis 3 Gew.-%. bezogen auf Fermentationsmedium, an Emulgatoren vorhanden sind. Geeignet sind hier physiologisch verträgliche Emulgatoren und insbesonders physiologisch verträgliche nichtionische Emulgatoren. So können beispielsweise Zuckerester oder auch Sorbitanester, ethoxylierte Zuckerester, ethoxyllierte Sorbitanester oder auch Alkylglycoside eingesetzt werden.

Als weitere Hilfsstoffe können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auch Schauminhibitoren zugesetzt werden. Bevorzugt sind bioverträgliche Schauminhibitoren, wie beispielsweise solche auf Basis Polypropylenglykol. Nötigenfalls können weitere übliche Hilfsstoffe zugesetzt werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Dicarbonsäuren entsprechen in ihrer Kettenlänge dem Säureanteil der eingesetzten Ester. Aufgrund der höheren Substratspezifität für C₁₂-Ester entsteht Dodecandsäure (Dekandicarbonsäure) besonderer Reinheit. So kann aus technischem Methyllaurat die genannte Säure in 98 %iger Reinheit erhalten werden.

Für viele Anwendungen sind die bei der Fermentation hergestellten gesättigten Dicarbonsäuregemische direkt einsetzbar. So können die Gemische beispielsweise direkt zur Modifizierung von Polymeren, insbesondere Harzen eingesetzt werden.

Die folgenden Beispiele wurden mit dem Stamm *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) durchgeführt.

45

Beispiele

50

Beispiel 1

55

1. Kulturbedingungen und Reaktionsführung

59

1.1 Stammhaltung

Malzextrakt-Schrägröhrchen sowie Lyophilisate

1.2 Schüttelkolben (100 ml Arbeitsvolumen)

1.2.1 Vorkultur I

5 24 stündige Inkubation einer Schrägröhrchenabimpfung in 100 ml YM-Bouillon (Yeast-Malt-Extrakt-Bouillon)
 pH 8 (Fa. Difco) bei 30 °C und 150 rpm auf der Schüttelmaschine

10 Vorkultur II

15	Yeast-Nitrogen-Base (Difco)	0,67 %
	Natriumacetat	0,3 %
	Pepton	0,3 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	Glucose	2 %
20	gelöst in 0,1 M Phosphat-Puffer	
	pH	7,2

Ansatz 100 ml in 500 ml Erlenmeyer-Schikane-Kolben

Inokulum 10 ml Vorkultur I

25 Inkubation bei 30 °C und 150 rpm Schüttelgeschwindigkeit bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose
 (ca. 24 Stunden)

1.2.2 Transformationskultur

30	Yeast-Nitrogen-Base (Difco)	0,67 %
	ethoxyliertes Sorbitan Monooleat	0,2 %
	Methylaurat (technisch)	4 %
	Phosphat-Puffer 0,2 M	
35	pH	8

Ansatz 50 ml in 500 ml Erlenmeyer-Schikane-Kolben

Inokulum 50 ml Vorkultur II

40 Reaktions-Ph Wert 7,2
 Inkubation bei 30 °C und 150 rpm Schüttelgeschwindigkeit Einhalten einer glucosefreien Induktionsphase (4 - 8 Stunden)
 tägliche Zudosierung von 0,5 % Glucose nach Ende der Induktionsphase
 tägliches Nachstellen des pH-Wertes auf 7,2
 45 tägliche Probennahme

Nach 96 Stunden Transformationszeit betrug die Dodecandisäureausbeute 10 g/l.

50 Beispiel 22. Herstellung im Kleinfermenter55 2.1 Kleinfermentation (1,5 l Arbeitsvolumen)

Gerätetyp Fa. Braun, Biostat E (Rührfermenter)

2.2 Vorkultur

5 24 stündige Inkubation einer Schrägröhrchenabimpfung in Würze-Bouillon (150 ml Fa. Merck).

2.3 Fermenterkultur

10

2.3.1 Medium

15

	Glucose	3 %
	Hefeextrakt	0.3 %
	Maisquellwasser	0.1 %
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2 %
	NH_4NO_3	0.1 %
20	NaH_2PO_4	0.1 %
	K_2HPO_4	0.15 %
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
	KCl	0.05 %
	MnCl_2	0.05 %
25	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 %
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 %
	Biotin	0.0001 %
	ethoxyliertes Sorbitan Monooleat	0.2 %
30	pH	6.0

2.3.2 Prozeßführung

35 Belüftung 1 vvm, Rührgeschwindigkeit 900 rpm, Antischaummittel auf Basis Polypropylenglykol, automatische pH-Regelung, pO_2 -Elektrode. Wachstumsphase bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose (24 bis 30 Stunden).

pH Shift von 6.0 auf 7.2: gleichzeitig Zugabe von 2 % Methylaurat

Substratzudosierung semi-kontinuierlich über die gesamte Fermentation.

40 Cosubstratzugabe (Glucose) je nach Bedarf der Zellatmung angepaßt, aber früheste Dosierung nach einer 4 bis 8 Stunden Induktionsphase.

Tägliche Probenahme

Nach 120 Stunden Transformationszeit betrug die Dodecandsäureausbeute 40 g/l.

45

Beispiel 3

50 Zur Bestimmung der Selektivität der eingesetzten Mutanten wurde mit Hilfe des Stammes *Candida tropicalis* DC2-C2009 (DSM 4277) eine Reihe unterschiedlicher Substrate umgesetzt. Die folgenden Ausbeuten wurden erhalten:

Kettenlänge	Alkan	Monosäure	Methylester
C12	2-3 g/l	0	10-12 g/l
C13	1 g/l	3 g/l	2 g/l
C14	1 g/l	4 g/l	3 g/l
C15	Spur	n.b.	n.b.
C16	0	0	1 g/l
n.b. = nicht bestimmt			

5

10

15

Ansprüche

1. Candida tropicalis-Stamm mit der Hinterlegungsbezeichnung DSM 4277 sowie dessen Mutanten und Varianten, die die Fähigkeit aufweisen, Methyllaurat mit einer höheren Transformationsgeschwindigkeit als dessen höhere Homologe in alphaomega-Dicarbonsäuren umzuwandeln.
2. Verfahren zur fermentativen Umwandlung von Fettsäureestergemischen, die zumindest anteilweise Laurinsäureester enthalten, in Dicarbonsäuren mit gleicher C-Atomanzahl, bezogen auf den Fettsäureteil, dadurch gekennzeichnet, daß die Umwandlung in Gegenwart eines Mikroorganismenstamms Candida tropicalis DC2-C2009 (DSM 4277) und/oder dessen Mutanten und/oder Varianten, die die Fähigkeit aufweisen, Methyllaurat mit höherer Transformationsgeschwindigkeit als dessen höhere Homologe in alphaomega-Dicarbonsäuren umzuwandeln, durchgeführt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsprodukte die Ester laurinsäurerreicher Fettsäuremischungen mit C₁-C₆-Alkoholen, vorzugsweise Monoalkoholen eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsprodukte Methylester von Kokosöl oder Palmkernöl oder voll synthetisch hergestellte Methyllaurate-Mischungen und/oder deren Destillate oder Anreicherungsprodukte eingesetzt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Candida tropicalis-Stamm DC2-C2009 in einer ersten Stufe bis zum praktisch vollständigen Verbrauch des Cosubstrats bei einem konstanten pH-Wert kleiner 7, aber größer 5,5 angezüchtet wird, der pH-Wert sodann auf einen Wert zwischen 7,1 und 8 angehoben wird und sodann ein oder mehrmals das Fettsäuregemisch zugesetzt wird, wonach man nach Verstreichen einer Induktionsphase von mehreren Stunden soviel Cosubstrat zudosiert, daß die Zellatmung aufrechterhalten bleibt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Fermentationsmedium Emulgatoren, Schauminhibitoren und gewünschtenfalls weitere Hilfsstoffe zugesetzt werden.

45

50

55